动物学研究 1995, 16 (3): 218, 222, 232, 254   CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

冷冻-解冻猪精子的超微结构观察*

ULTRASTRUCTURE OF FROZEN-THAWED SPERMATOZOA OF THE BOAR

关键词 猪，精液冷冻，超微结构

Key words Boar semen, Cryopreservation, Ultrastructure

自从50年代初Polge发现甘油有卓越的防冻作用以后，动物精液冷冻技术发展很快。现在，奶牛和羊冷冻精液已广泛应用于人工授精和体外受精中，效果与鲜精接近，而猪冷冻精液在人工授精后虽也能产仔，但妊娠率与每窝产仔数均下降（Johnson 等，1981）；体外受精率可达85%以上，但精子浓度需用5—6×10^7精子/ml，比鲜精用量提高25—100倍（Wang 等，1991）。顶体形态正常精子的减少是造成冷冻精液受精率低的重要原因之一（Pursel，1979），用光镜不能清楚地观察顶体的形态变化，但运用电镜技术对猪冷冻-解冻精子的顶体形态的超微结构研究报道不多（Courtens 等，1985；Hashizume，1990）。针对猪冷冻-解冻精子体内/体外受精能力降低的问题，我们用透射电镜对冷冻的猪精子解冻0 h及4 h后精子顶体与头部质膜的超微结构变化进行了观察。

1 材料与方法

1.1 猪精液冷冻-解冻方法（王玉珍，1979）①精液冻冻 将精子活力达0.8以上的猪精液浓缩并静置至室温（26—28℃），与等温冷冻液1∶1稀释，5℃平衡3 h后开始冷冻。将铜网悬于液氮面上1 cm，滴上稀释精液，每滴0.1 ml，冻结后浸入液氮中；抽样检查，解冻后精子活力达0.4以上者液氮中保存。冷冻液配方：乳糖3 g、葡萄糖2.1 g、柠檬酸钠0.31 g、氨基乙酸0.8 g、蒸馏水100 ml、甘油3.3 ml。用前加卵黄24.4 ml，双抗各5万单位。②冻精解冻：取冻精放入圆饭盒内，摇动30 s后放入55℃水浴，解冻至基本全融化时倒入38℃解冻液。解冻液配方：葡萄糖5 g、柠檬酸纳0.5 g、蒸馏水100 ml。

分别在解冻后0 h和38℃解冻液培养4 h后固定观察。

1.2 电镜观察标本制备方法 将样品以冷0.1 M二甲砷酸钠缓冲的混合醛固定液（含多聚甲醛0.5%、戊二醛3%）固定30 min，冷0.1M二甲砷酸钠缓冲液中漂洗两次，并于缓冲液中过夜，再以1%锇酸后固定1 h，冷缓冲液洗两次，于缓冲液中4℃过夜，精子在换液时需以2000 r/min离心10 min，然后常规脱水、渗透及Epon812包埋，超薄切片厚70—90 nm，铅铀双染，以JEM2000及JEM1200电子显微镜观察。

（下转第222页）

---

* 国家农业部“七、五”生物技术重点资助项目

本文1994年10月5日收到，同年11月14日修回

(上接第218页)

观察数据的差异显著性分析采用百分数 t 检验进行。

2 结果与讨论

2.1 解冻后0 h超微结构变化 本实验结果表明，冷冻-解冻猪精子顶体与质膜破坏严重，尽管在光镜下检查顶体完整率为90%，在电镜下，顶体丢失者也不多（5.7%），与光镜结果较接近，但大多数精子虽然有顶体但出现了质膜与顶体异常变化（78.7%），主要变化反映在头部质膜和顶体的变化。最显著的变化是很多精子顶体头部膨大成结节状，形成头褶（图2），此褶向后胀大，与后部的顶体外膜紧密接触、融合形成小泡（占总数的55.7%，68／122）（图3）。Peterson 等（1979）和 Cran 等（1976）的研究表明这种变化与精子衰老、死亡以及不育有关。我们认为，这是冷冻-解冻猪精子受精力下降的主要原因之一。这也说明用光镜下顶体完整性来判断冷冻效果的传统做法显然是不准确的。

表1 冷冻精子解冻后精子头部的超微结构变化

	质膜顶体均无变化	质膜膨大或呈泡状顶体无可见变化	顶体头部膨大成头褶顶体内形成小泡	顶体剧烈膨胀	顶体膨胀内有致密物	顶体丢失	顶体泡化
解冻后 0 h	21.3%[a]	5.7%	55.7%	5.7%	3.3%	5.7%	2.5%
解冻后 4 h	2.7%[b]	8%	58.7%	8%	9.3%	6.7%	6.7%

注：百分数 t 检验表明，a：b $P<0.01$，差异极显著。

我们观察到的其他异常变化还有：顶体强烈膨胀（5.7%，7／122）；膨胀顶体内有团状致密物（3.3%，4／122）；顶体泡化（2.5%，3／122）；精子质膜胀大或呈泡状但顶体无可见变化（5.7%，7／122）。质膜与顶体均无可见变化者有21.3%（26／122）。顶体丢失精子只占极少部分（5.7%，7／122）。Courtens 与 Paquinon（1985）报道猪精子冻精解冻后有60%顶体膨胀，而 Hashizume 等（1990）报道猪精子冷冻-解冻后有34%顶体膨胀，另有38.6%的精子头部质膜膨胀，但顶体无可见变化，共有94%的精子头部出现异常变化，我们的结果与他们的有所不同，这可能是由于冷冻-解冻方法的不同造成，通过对不同方法冷冻、解冻精子的比较形态学的进一步研究将有助于猪精液冷冻方法的改进。

2 解冻精子38℃培养4 h后的超微结构变化

鲜精在38℃培养4 h（猪精子体外获能方法之一，Cheng 等，1983）精子活力没有明显变化（0.8左右），电镜下精子质膜出现膨胀性获能变化，但顶体无任何结构变化（图4）（结果另发表）。而解冻精子在38℃培养4 h后活力急剧下降（从0.4—0.5降至0.02），从超微结构来看，培养4 h后同培养前相比，各种破坏性变化更加严重，顶体头褶更加膨大，也向后形成小泡（58.7%，44／75）（图5），顶体极度膨胀（8%，6／75），（图6），有的膨大顶体内也含有高电子致密度的团状物（9.3%，7／75）（图6），有的顶体发生泡化（6.7%，5／75），有的精子顶体无可见变化，质膜胀大或呈泡状（8%，6／75），质膜和顶体无可见变化的形态正常精子仅有2.7%（2／75），较刚解冻时显著减少（$P<0.01$），但仍然只有很少精子顶体丢失（6.7%，5／75）。

(下转第232页)